9 Séparation

Informations Techniques	**9 I 2**
Leucosep™	**9 I 3**
Tubes Leucosep™ 12 ml	9 I 3
Tubes Leucosep™ 50 ml	9 I 3
Guide d'utilisation Leucosep™	9 I 4
OncoQuick®	**9 I 5**

Séparation

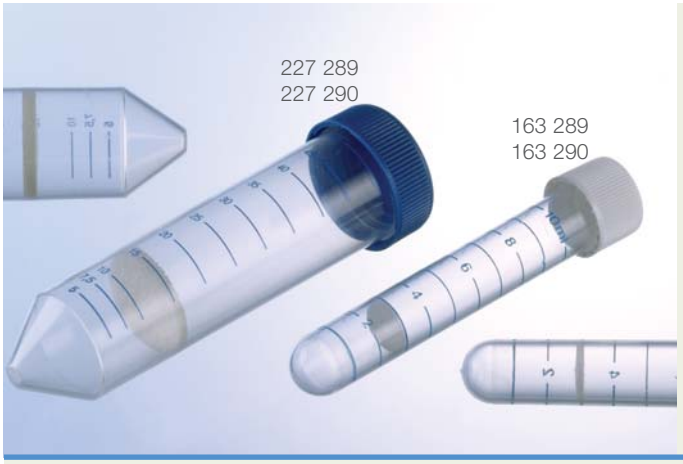
Différentes techniques de séparation peuvent être utilisées pour enrichir certaines molécules (ADN, ARN, protéines, organelles, vésicules, micelles, cellules, etc.) spécifiquement à partir de mélanges biologiques complexes (cellules et homogénats de tissus, sang, urine et autres fluides biologiques), de façon à pouvoir les étudier séparément. La séparation de ces fluides peut être basée soit sur la différence de vitesse de sédimentation des différentes particules dans un fluide ou sur leur différence de densité.
La centrifugation en gradient de densité (nommée aussi, centrifugation en bande, à l'équilibre ou isopycnique) exploite le principe de l'équilibre des particules d'une certaine densité dans une solution environnante de densité équivalente.
La première application de la centrifugation en gradient a été publiée dans les années 1950. Depuis, les organelles cellulaires sont enrichies grâce à des gradients de saccharose. Il est incontestable que le savoir acquis sur ces produits enrichis a contribué à établir les bases de la biologie moderne.

Il a été découvert depuis peu que l'enrichissement en cellules de mammifères demandait des milieux de séparation plus complexes du fait de leur sensibilité aux fluctuations osmotiques. Noble et Boyum ont décrit une méthode permettant de séparer les cellules mononuclées du sang total et de la moelle épinière en 1967 et 1968. Sur la base de ces travaux scientifiques, de nombreuses applications biomédicales en recherche et en diagnostic de routine actuelles requièrent des populations de cellules intactes viables et fonctionnelles comme matériel de départ. La séparation de telles cellules par gradient de densité est la méthode la plus largement utilisée de par sa simplicité et sa robustesse.

Avec le produit **Leucosep™** Greiner Bio-One atteint son objectif d'optimisation du gradient de densité par centrifugation, simple d'utilisation.
En complément, le produit **OncoQuick®** fut développé pour élargir l'application au secteur oncologie.

Leucosep™

Tubes Leucosep™ 12 ml et 50 ml



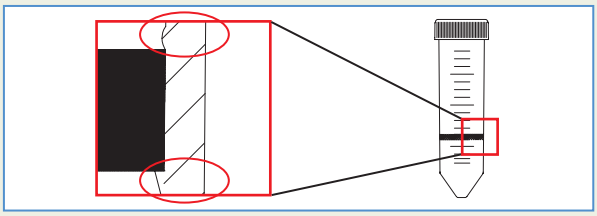
Leucosep™

Séparation performante des lymphocytes et mononucléaires (sang et moelle osseuse)

Caractéristiques:

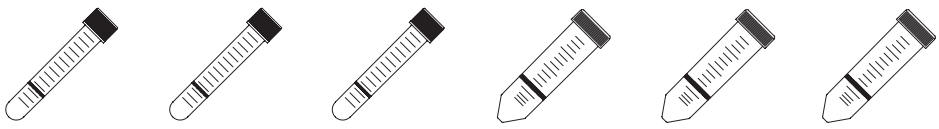
- Concentration directement à partir de sang total
- Remplissage simplifié à travers barrière poreuse
- Séparation rapide en 15 minutes à température ambiante
- Aucun équipement ou dispositif additionnel nécessaire
- Elimination des granulocytes et érythrocytes
- Pas de contamination érythrocytaire
- Pas de blocage des marqueurs
- Pré-rempli avec milieu Ficoll-Paque™ PLUS
- Disponible non rempli pour utilisation avec d'autres milieux séparateurs

Leucosep™ fut conçu pour un isolement optimal des lymphocytes et des mononucléaires (PBMCs) de sang total humain ou de la moelle osseuse. Le constituant clé de Leucosep™ est la barrière poreuse incorporée à l'intérieur du tube à centrifuger en polypropylène translucide. Cette barrière est en polyéthylène de haut grade. Elle présente une porosité homogène et permet un gain de temps d'exploitation de l'échantillon. L'échantillon de sang total (avec anticoagulant) ou de moelle osseuse peut être placé directement dans le tube Leucosep™. La barrière poreuse évite tout mélange entre le prélèvement et le milieu séparateur. Lors de la centrifugation, lymphocytes et mononucléaires sont séparés des éléments non désirés par gradient de densité et viennent constituer une interphase au-dessus du milieu séparateur. Lorsque la séparation est achevée, la barrière poreuse empêche toute contamination cellulaire de la fraction enrichie lors de sa récolte. Quelle que soit la séparation conduite sur milieu Ficoll-Paque™ PLUS ou avec un autre milieu séparateur, quel que soit le volume de l'échantillon: Greiner Bio-One possède le tube Leucosep™ adapté. Le mode d'emploi Leucosep™ et informations complémentaires sont disponibles sur www.gbo.com/bioscience.



Nouveau: les tubes Leucosep™ 50 ml disposent dorénavant d'**anneaux** qui stabilisent la barrière poreuse afin d'assurer une meilleure résistance et utilisation, par exemple durant la centrifugation.

non-cytotoxic | non-pyrogenic



Référence	163 288	163 289	163 290	227 288	227 289	227 290
Description	Tubes Leucosep™ avec barrière poreuse	Tubes Leucosep™ avec barrière poreuse	Tubes Leucosep™ avec barrière poreuse	Tubes Leucosep™ avec barrière poreuse	Tubes Leucosep™ avec barrière poreuse	Tubes Leucosep™ avec barrière poreuse
Volume [ml]	12	12	12	50	50	50
Milieu de séparation	+/pré-rempli avec Ficoll-Paque™ PLUS	-	-	+/pré-rempli avec Ficoll-Paque™ PLUS	-	-
Stérilité	as	-	+	as	-	+
Volume de l'échantillon	3 – 8 ml sang	3 – 8 ml sang	3 – 8 ml sang	15 – 30 ml sang	15 – 30 ml sang	15 – 30 ml sang
Qté par sachet/carton	50/500	50/500	50/500	25/250	25/300	25/300

Les tubes Leucosep™ pré-remplis de Ficoll-Paque™ PLUS sont conditionnés par Greiner Bio-One.
Ficoll-Paque™ PLUS est une marque déposée de GE Healthcare.

as = produit en condition aseptique

Guide d'utilisation Leucosep™

Méthode

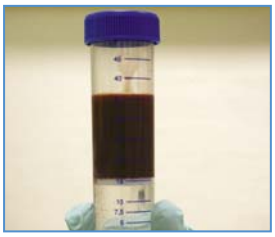
Leucosep™ fut conçu pour un isolement optimal des lymphocytes et mononucléaires (PBMCs) du sang total humain ou de la moelle osseuse, selon un gradient de densité s'établissant durant la centrifugation. Le constituant clé de Leucosep™ est la barrière poreuse incorporée à l'intérieur du tube à centrifuger en polypropylène translucide. Cette barrière est en polyéthylène de haut grade. Elle présente une porosité homogène et permet un gain de temps d'exploitation de l'échantillon. L'échantillon de sang total (avec anticoagulant) ou de moelle osseuse peut être placé directement dans le tube Leucosep™. La barrière poreuse évite tout mélange entre le prélèvement et le milieu séparateur. Lors de la centrifugation, lymphocytes et mononucléaires sont séparés des éléments non désirés par gradient de densité et viennent constituer une interphase au-dessus du milieu séparateur. Lorsque la séparation est achevée, la barrière poreuse empêche toute contamination cellulaire de la fraction enrichie lors de sa récolte.

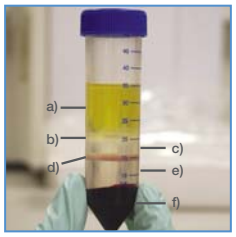
Préparation

- Préparer le milieu séparateur à température ambiante.
- Remplir le tube Leucosep™ avec le milieu séparateur: 3 ml de milieu si les tubes Réf. 163 289 ou Réf. 163 290 sont utilisés, 15 ml de milieu si les tubes Réf. 227 289 ou Réf. 227 290 sont utilisés.
- Refermer les tubes contenant le milieu séparateur avec le bouchon vissant et centrifuger pendant 30 secondes à 1000 g à température ambiante. Le milieu séparateur se retrouve ainsi en dessous de la barrière poreuse.
- Lorsque des tubes pré-remplis (Réf. 163 288 ou Réf. 227 288) sont utilisés, les étapes suscitées ne sont pas concernées. Manipuler simplement ces tubes à température ambiante.
- Les tubes sont maintenant prêts à recevoir l'échantillon de sang total ou de moelle osseuse aspirée. La dilution de l'échantillon avec une solution saline équilibrée n'est pas obligatoire mais elle peut contribuer à la qualité de la séparation. Pour l'échantillon sanguin une dilution de 1 pour 2, pour l'échantillon de moelle osseuse une dilution de 1 pour 4 sont recommandées.

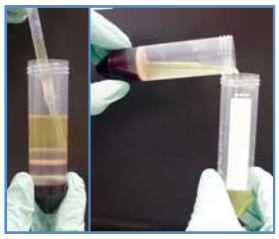
Procédure

1) Verser l'échantillon


2) Avant centrifugation



3) Après centrifugation


4) Récolter avec pipette pasteur ou en décantant dans un autre tube à centrifuger

1) Placer délicatement l'échantillon avec anticoagulant (sang ou moelle osseuse aspirée, dilué si nécessaire) directement du tube à prélèvement vers l'intérieur du tube Leucosep™: 3 à 8 ml d'échantillon pour les tubes Réf. 163 288,163 289 ou 163 290; 15 à 30 ml d'échantillon pour les tubes Réf. 227 288, 227 289 ou 227 290.

2) Centrifuger 10 minutes, 1000 g à température ambiante ou 15 minutes, 800 g à température ambiante avec rotor angulaire. Ôter le frein de la centrifugeuse.

3) A l'issue de la centrifugation, les différentes phases constituées du haut vers le bas sont: a) Plasma - b) fraction cellulaire enrichie (Lymphocytes et mononucléaires) - c) milieu séparateur - d) barrière poreuse - e) milieu séparateur - f) agrégats (erythrocytes et granulocytes). Le prélèvement et l'élimination des 5 à 10 premiers mm de plasma évitent la contamination éventuelle par les plaquettes.

4) Récolter la fraction cellulaire enrichie (lymphocytes/mononucléaires) à l'aide d'une Pasteurpette ou en plaçant dans un tube à centrifuger les phases situées au dessus de la barrière poreuse. Cette dernière évitant en effet toute contamination par les érythrocytes ou les granulocytes.

5) Laver la fraction cellulaire enrichie (lymphocytes/mononucléaires) avec 10 ml de tampon phospaté (PBS), centrifuger pendant 10 minutes à 250 g.

6) Répéter l'étape de lavage 2 fois, remettre en suspension l'agrégat cellulaire dans 5 ml de PBS.

Attention

Utiliser les échantillons biologiques et dispositifs de prélèvements sanguins conformément aux procédures en vigueur dans votre établissement. En cas de contact ou contamination avec l'échantillon sanguin ou autres (piqûres, dispositifs, etc …), un traitement médical approprié devra être initié, considérant le caractère potentiel contaminant (HBV, HCV, HIV ou autres) de l'échantillon ou du dispositif ayant servi au prélèvement.

OncoQuick®

227 250

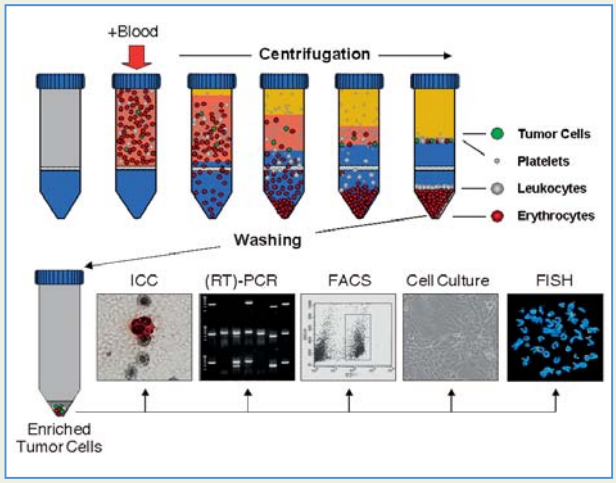
OncoQuick®

Enrichissement en cellules tumorales circulantes disséminées à partir de sang total

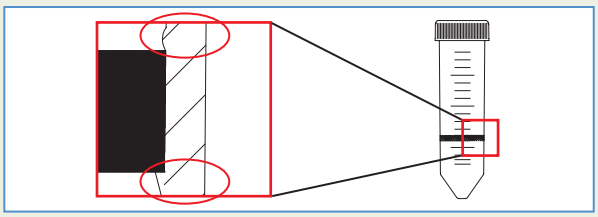
Caractéristiques:

- Résultat en 45 minutes
- Récupération reproductible > 70 %
- Elimination des cellules du sang jusqu'à 6 unités log
- Pas d'équipement laboratoire additionnel
- Pas de billes magnétiques
- Pas de blocage des molécules marqueur
- Enrichissement directement à partir de sang total

OncoQuick® est un système simple, rapide et efficace d'enrichissement des cellules tumorales circulantes relarguées par des tumeurs solides ou des mélanomes malins. OncoQuick® combine les avantages de la séparation par centrifugation en gradient (rapide, reproductible et d'un coût raisonnable) avec une efficacité équivalente aux méthodes immunobilles.
OncoQuick® se présente sous la forme d'un tube polypropylène avec une barrière poreuse insérée au dessus d'une solution de séparation développée spécifiquement. Jusqu'à 30 ml de sang total anticoagulé sont déposés directement dans le tube OncoQuick®, et centrifugés. En dehors des érythrocytes et des granulocytes, le milieu de séparation permet l'élimination virtuelle des lymphocytes et des cellules mononuclées.
Les cellules tumorales circulantes sont concentrées à l'interface. Après collecte, la fraction enrichie en cellules est lavée.
Les cellules tumorales sont alors disponibles pour toutes les méthodes classiques de recherche. OncoQuick® a été développé en coopération entre Hexal Gentech et Greiner Bio-One et est réservé à un usage recherche seulement!



Des informations sur l'utilisation d'OncoQuick® peuvent être trouvées sur www.gbo.com/bioscience.



Nouveau: les tubes OncoQuick® 50 ml disposent dorénavant d'**anneaux** qui stabilisent la barrière poreuse afin d'assurer une meilleure résistance et utilisation, par exemple durant la centrifugation.

non-cytotoxic | non-pyrogenic

Référence	**227 255*)**	**227 250**
Description	Tubes OncoQuick® avec barrière poreuse et milieu séparateur	Tubes OncoQuick® avec barrière poreuse et milieu séparateur
Stérilité	as	as
Volume de l'échantillon	15 – 30 ml sang	15 – 30 ml sang
Qté par carton	4	10

*) emballage échantillon disponible 1 fois seulement

as = produit en condition aseptique